

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Jc978 U.S. PRO
09/909672
07/20/01
#3

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 36 469.1
Anmeldetag: 25. Juli 2000
Anmelder/Inhaber: Bayer Aktiengesellschaft,
Leverkusen/DE
Bezeichnung: Ultraspiracle (USP)-Protein von Heliothis virescens
IPC: C 12 N, C 07 K, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. April 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Faust

Ultraspiracle (USP)-Protein von Heliothis virescens

5 Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit der biologischen Aktivität des Ultraspiracle-Proteins kodieren, sowie solche Polypeptide per se. Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zum Auffinden insektizider Wirkstoffe, sowie zur kontrollierten Expression von Zielgenen (Gene Switch).

10 Das Ultraspiracle-Protein (im Folgenden als USP bezeichnet) ist das Insektenorthologe des Vertebraten Retinoid X Rezeptors (RXR). Wie RXR gehört es zur Familie der Kernrezeptoren. Diese Kernrezeptoren befinden sich im Zellinneren. Sie binden als Homo- oder Heterodimere an responsive Elemente auf der DNA und regulieren die Expression von Genen. Um aktiv zu sein, müssen sie spezielle kleine, hydrophobe Liganden (z.B. Steroide, Retinoide, Vitamin D) binden. Kernrezeptoren 15 besitzen eine modulare Struktur mit funktionellen Domänen für Transaktivierung, DNA-Bindung und Ligandenbindung. Die DNA-Bindedomäne enthält eine Anzahl von Cystein-Resten und bildet eine charakteristische Struktur, den sogenannten Zinkfinger.

20 Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften (DNA-Bindung an spezifische Elemente, Aktivierung nachgeschalteter Gene) eignen sich Kernrezeptoren als Komponenten für regulierbare Expressionssysteme (Gene Switch). Einige Kernrezeptoren (z.B. RXR, EcR) finden bereits Verwendung in induzierbaren, eukaryotischen Expressionssystemen (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, USA).

25 In Insekten wird z.B. die Entwicklung von der Larve zum adulten Insekt über Kernrezeptoren unter Beteiligung des Steroidhormons Ecdyson sowie des Isoprenoids Juvenilhormon gesteuert (1;2;3;4). Eine Schlüsselrolle spielt hierbei der Ecdysonrezeptor, ein Kernrezeptor, der aus zwei verschiedenen Untereinheiten, EcR und USP, zusammengesetzt ist (5;6;7). Während bereits seit langem das Hormon Ecdyson (in seiner aktiven Form 20-Hydroxyecdyson) als Ligand für die EcR-Unter-

einheit bekannt ist, handelt es sich bei USP um einen Orphanrezeptor, für den bisher noch kein Ligand identifiziert werden konnte.

Der Ecdysonrezeptor stellt ein wichtiges Insektizid-Target dar. Wird er außerhalb des
5 in der Insektenentwicklung dafür vorgesehenen zeitlichen Fensters aktiviert, so führt dies zu schweren Störungen bis hin zum Absterben des Insekts. Auf diesem Mechanismus beruhen insektizide Ecdysonagonisten (8;9). Hierbei handelt es sich um nicht-steroidale Liganden der EcR-Untereinheit, die spezifisch auf Lepidopteren wirken (10). Da die Ecdyson/Juvenilhormon gesteuerte Entwicklung nur bei Invertebraten zu finden ist und in Vertebraten nicht vorkommt, stellt sie einen für den
10 Anwender sicheren insektiziden Mechanismus dar.

Die Proteinsequenz einer Anzahl von Insekten-USPs ist bereits bekannt. So sind z.B.
15 die Sequenzen von Drosophila melanogaster, Manduca sexta, Choristoneura fumiferana und Bombyx mori beschrieben (11).

Da es sich bei USP um einen Orphanrezeptor handelt, für den bisher kein Ligand bekannt ist, ist dieser Rezeptor von großer praktischer Bedeutung für die Etablierung von Screeningsystemen für die Suche nach neuen Liganden, die dann u.a. als Insektizide eingesetzt werden können. Stehen Liganden für USP bereit, so kann dieser
20 Kernrezeptor in Systemen zur kontrollierten Expression von Zielgenen (Gene Switch) Verwendung finden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nukleinsäuren, welche für Polypeptide mit der biologischen Aktivität von USP kodieren und eine Sequenz umfassen, ausgewählt aus:

- a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
- 30 b) Sequenzen, welche eine zumindest 85 %ige Identität, vorzugsweise eine zumindest 90%ige Identität, besonders bevorzugt eine zumindest 95%ige

Identität mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 über eine Länge von wenigstens 600 fortlaufenden Nukleotiden und vorzugsweise über deren Gesamtlänge aufweisen,

- 5 c) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter (a) und (b) definierten Sequenzen,
- 10 d) Teile der unter (a), (b) und (c) definierten Sequenzen, die für Polypeptide kodieren, welche im Wesentlichen dieselbe biologische Aktivität ausüben wie ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2.

15 Der Grad der Identität der Nukleinsäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programm Paket GCG, Version 9.1 unter Standardeinstellungen.

20 Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Vektoren, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Plasmide, Phasmide, Cosmide, YACs oder künstliche Chromosomen verwendet werden. Für die Expression der erfindungsgemäßen Nuklein-
25 säuren können diese mit üblichen regulatorischen Sequenzen verknüpft werden. Die Auswahl solcher regulatorischen Sequenzen ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen bzw. zellfreie Systeme verwendet werden. Besonders bevorzugt als Expressionskontrollsequenz sind z.B. der frühe oder späte Promotor des SV40 oder des Adenovirus, des Cytomegalovirus, der Immediate Early Promoter des AcMNPV, das lac-System, das trp-System, die Haupt-Operator- und Promotor-
30 regionen des Phagen lambda, die Kontrollregionen des fd-Hüllproteins, der Promotor der 3-Phosphoglyceratkinase, der Promotor der Sauren Phosphatase, der Promotor des α -Mating-Faktors der Hefe und der 35S Promoter des Blumenkohlmosaikvirus. Der Ausdruck "Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich allgemein auf Expressionskontrollsequenzen.

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können diese in geeignete Wirtszellen eingebracht werden. Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht enthalten. Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, vorzugsweise E.coli, als auch eukaryotische Zellen wie Säuger-, Insekten und Pflanzenzellen. Beispiele für geeignete einzellige Wirtszellen sind: Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, Hefen, HEK-293-, Schneider S2-, SF9-, CHO-, COS1-, COS7-Zellen. Es eignen sich aber auch Zellen, die Bestandteil komplexer Systeme (z.B. ganze Pflanzen oder Tiere) sind. Daher sind auch transgene Organismen (ausgenommen Menschen), wie beispielsweise Pflanzen und Tiere, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, Gegenstand dieser Erfindung. Der Ausdruck "transgen", wie er hierin verwendet wird, bedeutet, dass die erfindungsgemäße Nukleinsäure mittels gentechnischer Verfahren in den Organismus eingebracht wurde.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden, sowie die daraus aufgebauten Rezeptoren bestehend aus einer EcR-Untereinheit und einem erfindungsgemäßen Polypeptid.

Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranskriptionale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-

Derivaten oder Phophatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.

Die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide lässt sich beispielsweise durch einen Transaktivierungstest nachweisen. Dazu wird ein zu testendes Polypeptid in Kombination mit einer EcR-Untereinheit und einem Reporterkonstrukt bestehend aus einem Promoter mit EcR-Bindungssequenz und einem Reporterogen in einem Zellsystem exprimiert. Wenn in Anwesenheit von Ecdyson bzw. einer Ecdyson-analogen Verbindung das Reporterogenprodukt z.B. durch einen Enzymtest detektiert werden kann, bedeutet dies, dass das getestete Polypeptid die biologische Aktivität eines erfindungsgemäßen Polypeptids besitzt.

Geeignete Reportergene und Bindungssequenzen sind beispielsweise in der WO 97/45737 beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide müssen nicht vollständige USPs darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch die biologische Aktivität eines Polypeptids (USP) mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweisen. Dabei müssen die erfindungsgemäßen Polypeptide nicht direkt von einem USP von Heliothis virescens ableitbar sein.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können im Vergleich zu der entsprechenden Region eines natürlich vorkommenden USPs von *Heliothis virescens* Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch die biologische Aktivität eines USPs ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt.

5 Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
- 10 2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

15 Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr

Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polypeptide stellt ein USP von Heliothis virescens dar, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 besitzt.

5

Weiterhin sind Antikörper Gegenstand der Erfindung, die spezifisch an die vorstehend genannten Polypeptide bzw. Rezeptoren binden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt auf die übliche Weise. Beispielsweise können solche Antikörper produziert werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für die Antikörperproduktion effektiven Menge eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Gewinnung dieses Antikörpers. Weiterhin lässt sich in an sich bekannter Weise eine immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert. Die Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein. Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin. Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen. Daher erstreckt sich der Ausdruck "Antikörper", wie er hierin verwendet wird, auch auf Teile vollständiger Antikörper, wie Fa-, F(ab')₂- oder Fv-Fragmente, welche noch die Fähigkeit besitzen, an die Epitope der erfindungsgemäßen Polypeptide zu binden.

Zur Herstellung der Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden, können Wirtszellen, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Die

gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden.

Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäßen Polypeptide, die von
5 Wirtszellen unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure synthetisiert
werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner
auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispiels-
weise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Gluta-
thion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle
10 proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und
dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker
kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste
einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker
15 zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligo-
nukleotiden angewendet werden.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren auf präparativer Elektrophorese,
FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht
hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-
20 Chromatographie und Affinitätschromatographie.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auf die übliche Weise hergestellt
werden. Beispielsweise können die Nukleinsäuremoleküle vollständig chemisch
synthetisiert werden. Man kann auch nur kurze Stücke der erfindungsgemäßen Se-
25 quenzen chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem
Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können verwendet
werden, um ausgehend von Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durch-
suchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Iso-
lierung der betreffenden DNA ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten
30 DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

5 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können zur Isolierung und Charakterisierung der regulatorischen Regionen, die natürlicherweise benachbart zu der kodierenden Region vorkommen, verwendet werden. Solche regulatorischen Regionen sind somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10 Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können durch in vivo-Verfahren neue Liganden der USP-Untereinheit eines Ecdysonrezeptors identifiziert werden. Dazu kann beispielsweise ein rekombinantes DNA-Molekül, das zumindest eine erfindungsgemäße Nukleinsäure umfasst, in eine geeignete Wirtszelle eingebracht werden. Die Wirtszelle wird in Gegenwart einer chemischen Verbindung oder eines Gemisches an chemischen Verbindungen unter Bedingungen kultiviert, die die Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide erlauben. Eine Aktivierung oder Hemmung des Rezeptors kann durch Transaktivierung eines Reportergens (z.B. Luciferase, beta-Galactosidase) detektierbar gemacht werden, dem ein geeigneter Promotor mit USP-Bindungssequenz (12) vorgeschaltet ist.

20 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ermöglichen auch das Auffinden von Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden, durch in vitro-Verfahren. Die erfindungsgemäßen Polypeptide können mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Wechselwirkung zumindest einer Verbindung mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid erlauben. Die Bindung von Verbindungen an ein erfindungsgemäßes Polypeptid kann z.B. durch Verdrängung eines radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten Liganden nachgewiesen werden. Hierzu kann auch ein erfindungsgemäßes Polypeptid markiert werden, um z.B. die Anwendung einer "Fluorescence Resonance Energy Transfer" (FRET)-Methode zu erlauben.

Auf diese Weise aufgefundene Liganden können als neue insektizide Substanzen im Pflanzenschutz Verwendung finden. Solche Liganden können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein.

- 5 Eine weitere Anwendung der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Nuklein-säuren, Vektoren und regulatorischen Regionen besteht in ihrer Nutzung als chemisch induzierbare Expressionssysteme (Gene Switch) für unterschiedliche Zielgene. Hierzu können die Nukleinsäuren wie oben beschrieben in Wirtszellen exprimiert werden. Die Zielgene werden in Expressionsvektoren einkloniert, die mit einem geeigneten Pro-
10 motor mit regulatorischen Regionen versehen sind. Diese Expressionsvektoren werden dann ebenfalls in die Wirtszellen gebracht. Die Regulierung der Zielgen-Transkription kann durch Zugabe eines wie oben beschriebenen Liganden zu den Wirtszellen erfolgen. Neben der Verwendung in kultivierten Zellen ist insbesondere die Verwen-
15 dung in Pflanzen vorteilhaft, weil Pflanzen über keine endogenen Kernrezeptoren verfügen, und zur Zeit noch kein anderes gut funktionierendes chemisch induzier-
bares Expressionssystem für Pflanzen zur Verfügung steht. In der Erzeugung von Proteinen in Pflanzen liegt ein großes Potenzial. Aber auch therapeutische Anwen-
dungen an Tieren einschließlich des Menschen sind möglich.

20 **Erläuterungen zum Sequenzprotokoll:**

SEQ ID NO: 1 zeigt die Nukleotidsequenz des Heliothis virescens USP. SEQ ID NO:
2 zeigt die Aminosäuresequenz des von der Heliothis virescens USP-Nukleotid-
sequenz abgeleiteten Proteins.

25

Beispiele:

Beispiel 1

5 Isolierung der beschriebenen Polynukleotide

Die Manipulation von Polynukleotiden erfolgte nach Standardmethoden der rekombinanten DNA Technologie (13). Die bioinformatische Bearbeitung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen erfolgten mit dem Programm Paket GCG Version 9.1
10 (GCG Genetics Computer Group, Inc., Madison Wisconsin, USA).

Die RNA für die cDNA-Bibliothek wurde aus gesamten Heliothis virescens-Larven (2. und 3. Larvenstadium) mittels Trizol-Reagenz (Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers) isoliert. Aus diesen RNAs wurden nun die poly A enthaltenden RNAs
15 durch Reinigung über Dyna Beads 280 (Dynal) isoliert. 5 µg dieser poly A enthaltenden RNAs wurden anschließend in die Konstruktion der cDNA-Bibliothek mit dem λ-ZAPExpress Vektor eingesetzt (cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit und ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit, alle Stratagene). In Abweichung von den Angaben des Herstellers wurde zur cDNA-Synthese die
20 Reverse Transkriptase Superscript (Gibco BRL) bei einer Synthesetemperatur von 45°C verwendet. Außerdem wurde auf die Zugabe radioaktiv markierter Desoxynukleosidtriphosphate verzichtet. Des Weiteren wurden die synthetisierten cDNAs nicht über das im Kit enthaltene Gelfiltrationsmedium, sondern über Size Sep 400 Spun Columns (Pharmacia) fraktioniert.

25 Alle Screens erfolgten mit Hilfe des DIG Systems (alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien Boehringer Mannheim, nach Angaben im "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization", Boehringer Mannheim). Die eingesetzten DNA-Sonden wurden durch PCR mittels Digoxigenin markiertem dUTP präpariert.
30 Die Hybridisierungen erfolgten in DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim) bei 40°C über Nacht. Der Nachweis markierter DNA auf Nylonmembranen geschah durch

Chemolumineszenz (CDP-Star, Boehringer Mannheim) unter Verwendung von Röntgenfilmen (Hyperfilm MP, Amersham). Die isolierten Genbankplasmide wurden zur Identifikation mittels T3 und T7 Primer ansequenziert (ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, ABI, mit ABI Prism 310 Genetic Analyzer). Die Bestimmung der vollständigen Polynukleotidsequenzen erfolgte durch Primer Walking mittels Cycle Sequencing als Auftragssequenzierung bei der Firma Qiagen, Hilden.

Literatur:

10

1. Segraves W.A. (1994): Steroid Receptors and Other Transcription Factors in Ecdysone Response. *Recent Progress in Hormone Research*, 49, 167-195
2. Henrich V.C. & Brown N.E. (1995): Insect Nuclear Receptors: A Developmental and Comparative Perspective. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25 (8), 881-897
3. Thummel C.S. (1995): From Embryogenesis to Metamorphosis: The Regulation and Function of *Drosophila* Nuclear Receptor Superfamily Members. *Cell* 83, 871-877
4. Truman J.W. (1996): Ecdysis Control Sheds Another Layer. *Science* 271, 40-41
5. Yao T et al. (1993): Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspireacle genes. *Nature* 366, 476-479
6. Hall B.L. & Thummel C.S. (1998): The RXR homolog Ultraspireacle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development* 125, 4709-4717
7. Lezzi M. et al. (1999): The Ecdysone Receptor Puzzle. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41, 99-106
8. Mikitani K. (1996): Ecdysteroid Receptor Binding Activity and Ecdysteroid Agonist Activity at the Level of Gene Expression are Correlated with the Activity of Dibenzoyl Hydrazines in Larvae of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 42 (10), 937-941

25

30

9. Dhadialla T.S. et al. (1998): New Insecticides with Ecdysteroidal and Juvenile Hormone Activity. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 545-569.
10. Sundaram M. et al. (1998): Basis for selective action of a synthetic molting hormone agonist, RH-5992 on lepidopteran insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 693-704
- 5 11. Oro A.E. et al. (1990): Relationship between the product of the Drosophila ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature* 347, 298-301
12. Vögeli M. et al. (1998): High level transactivation by the ecdysone receptor complex at the core recognition motif. *Nucl. Acid Res.* 26 (10), 2407-2414
- 10 13. Sambrook et al. (1989): *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Press

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, die für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität des Ultraspiracle-Proteins kodiert, umfassend eine Sequenz ausgewählt aus
5 (a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,

(b) Sequenzen, welche eine zumindest 85%ige Identität mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 über eine Länge von wenigstens 600 fortlaufenden Nukleotiden aufweisen,

(c) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter (a) und (b) definierten Sequenzen,

15 (d) Teile der unter (a), (b) und (c) definierten Sequenzen, die für Polypeptide kodieren, welche im Wesentlichen dieselbe biologische Aktivität ausüben wie ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2.

20 2. Vektor umfassend zumindest eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.

3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäuremolekül funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.

25 4. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder einen Vektor gemäß Anspruch 2 oder 3.

30 5. Wirtszelle nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pro- oder eukaryotische Zelle handelt.

6. Wirtszelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryotische Zelle E.coli ist.
- 5 7. Wirtszelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryotische Zelle eine Hefe-, Säuger-, Insekten- oder Pflanzenzelle ist.
8. Transgener Organismus, ausgenommen der Mensch, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder einen Vektor gemäß Anspruch 2 oder 3.
- 10 9. Polypeptid, welches von einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 kodiert wird.
- 10 10. Rezeptor umfassend eine EcR-Untereinheit und ein Polypeptid gemäß Anspruch 9.
- 15 11. Antikörper, welcher spezifisch an ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 bindet.
12. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 umfassend die folgenden Schritte:
 - 20 (a) Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7 unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 gewährleisten, und
 - (b) Gewinnen des Polypeptids aus den Zellen oder dem Kulturmedium.
13. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 umfassend die folgenden Schritte:
 - 25 (a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise oder

(b) chemische Synthese von Oligonukleotiden, Markieren der Oligonukleotide, Hybridisieren der Oligonukleotide an DNA einer Insekten-cDNA-Bank, Selektieren von positiven Klonen und Isolieren der hybridisierenden DNA aus positiven Klonen oder

5

(c) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der Ziel-DNA mittels PCR.

14. Regulatorische Region, welche natürlicherweise die Transkription einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 in Insektenzellen kontrolliert und eine spezifische Expression gewährleistet.

15. Verfahren zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz, insbesondere von Verbindungen, welche die Aktivierung oder Hemmung eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 oder eines Rezeptors gemäß Anspruch 10 verursachen, umfassend die folgenden Schritte:

(a) Bereitstellen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7,
20 (b) Kultivieren der Wirtszelle in der Gegenwart einer chemischen Verbindung oder eines Gemisches von chemischen Verbindung, und
(c) Detektieren der Aktivierung bzw. der Hemmung des Polypeptids bzw. Rezeptors.

25

16. Verfahren zum Auffinden einer Verbindung, die an ein Polypeptid gemäß Anspruch 9 bindet, umfassend die folgenden Schritte:

30 (a) Inkontaktbringen eines Polypeptids gemäß Anspruch 9 mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen,

die die Interaktion der Verbindung(en) mit dem Polypeptid erlauben,
und

- (b) Bestimmen der Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.

5

17. Verfahren zur induzierbaren Expression von Zielgenen mittels eines Polypeptids gemäß Anspruch 9, umfassend die folgenden Schritte:

- 10 (a) Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7 oder Bereitstellen eines transgenen Organismus gemäß Anspruch 8 unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 gewährleisten, wobei die Wirtszelle bzw. der transgene Organismus ein Zielgens mit geeigneten regulatorischen Sequenzen enthält, und

- 15 (b) Inkontaktbringen der Wirtszelle bzw. des transgenen Organismus mit einer chemischen Verbindung, die die Expression des Zielgens induziert.

- 20 18. Verwendung zumindest einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, eines Vektors gemäß Anspruch 2 oder 3, einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, eines transgenen Organismus gemäß Anspruch 8, eines Polypeptids gemäß Anspruch 9, eines Rezeptors gemäß Anspruch 10 oder einer regulatorischen Region gemäß Anspruch 14 zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz.

25

19. Verwendung zumindest einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, eines Vektors gemäß Anspruch 2 oder 3, einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, eines transgenen Organismus gemäß Anspruch 8, eines Polypeptids gemäß Anspruch 9, eines Rezeptors gemäß Anspruch 10, einer regulatorischen Region gemäß Anspruch 14 oder eines Verfahrens gemäß Anspruch 17 zur

30

gezielten Veränderung der biologischen Eigenschaften einer Wirtszelle oder eines Wirtsorganismus.

Ultraspiracle (USP)-Protein von Heliothis virescens

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit der biologischen Aktivität des Ultraspiracle-Proteins kodieren, sowie solche Polypeptide per se. Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zum Auffinden insektizider Wirkstoffe, sowie zur kontrollierten Expression von Zielgenen (Gene Switch).

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bayer Aktiengesellschaft

<120> Ultraspiracle (USP) -Protein von Heliothis virescens

<130> Le A 34 771

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1398

<212> DNA

<213> Heliothis virescens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1398)

<400> 1

atg tcc gtg gcg aag aaa gac aag ccg aca atg tcg gtg aca gca ctt 48
Met Ser Val Ala Lys Lys Asp Lys Pro Thr Met Ser Val Thr Ala Leu
1 5 10 15

atc aac tgg gct cga ccc ttg ccg ccg ggc caa cag cag cag ccg atg 96
Ile Asn Trp Ala Arg Pro Leu Pro Pro Gly Gln Gln Gln Gln Pro Met
20 25 30

acg cct acg tcg ccc gga aac atg ctt caa ccg atg gct acg ccg tct 144
Thr Pro Thr Ser Pro Gly Asn Met Leu Gln Pro Met Ala Thr Pro Ser
35 40 45

aac tta ccg act gtc gac tgc tca ctc gat att caa tgg cta aac ttg 192
Asn Leu Pro Thr Val Asp Cys Ser Leu Asp Ile Gln Trp Leu Asn Leu
50 55 60

gag gga ggt ttt atg tcg ccg atg tca ccg ccg gag atg aag cca gac 240
Glu Gly Gly Phe Met Ser Pro Met Ser Pro Pro Glu Met Lys Pro Asp
65 70 75 80

acg gcg atg cta gac ggc ctg cga gac gac tcc acc cca ccc cca gct 288
Thr Ala Met Leu Asp Gly Leu Arg Asp Asp Ser Thr Pro Pro Pro Ala
85 90 95

ttc aag aac tac ccc ccg aac cat ccc cta agt ggt tct aag cac ctc			336
Phe Lys Asn Tyr Pro Pro Asn His Pro Leu Ser Gly Ser Lys His Leu			
100	105	110	
tgt tct ata tgt gga gat aga gcg tcg ggg aaa cat tat gga gta tac			384
Cys Ser Ile Cys Gly Asp Arg Ala Ser Gly Lys His Tyr Gly Val Tyr			
115	120	125	
agt tgt gaa ggt tgc aaa ggt ttc ttc aaa agg acg gta aga aaa gac			432
Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val Arg Lys Asp			
130	135	140	
tta acg tac gca tgc cgc gaa gaa cgt aac tgc atc ata gac aaa cgc			480
Leu Thr Tyr Ala Cys Arg Glu Glu Arg Asn Cys Ile Ile Asp Lys Arg			
145	150	155	160
cag agg aac aga tgc cag tac tgt agg tac cag aaa tgt ctc gcg tgc			528
Gln Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Tyr Gln Lys Cys Leu Ala Cys			
165	170	175	
ggc atg aag agg gaa gcg gtg cag gag gag agg cag agg gcc gcc aga			576
Gly Met Lys Arg Glu Ala Val Gln Glu Glu Arg Gln Arg Ala Ala Arg			
180	185	190	
ggt acg gag gat gca cat ccg agc agc tcg gtg cag gta cag gag tta			624
Gly Thr Glu Asp Ala His Pro Ser Ser Ser Val Gln Val Gln Glu Leu			
195	200	205	
tca atc gag cgg ttg ctg gag atg gag tca ctg gta gct gac ccc agc			672
Ser Ile Glu Arg Leu Leu Glu Met Glu Ser Leu Val Ala Asp Pro Ser			
210	215	220	
gaa gag ttc cag ttc ctt cgt gtg gga ccc gac agt aat gtg ccg cct			720
Glu Glu Phe Gln Phe Leu Arg Val Gly Pro Asp Ser Asn Val Pro Pro			
225	230	235	240
aag ttc cgc gcc cct gtc tcc agc ctt tgt caa ata ggc aac aaa caa			768
Lys Phe Arg Ala Pro Val Ser Ser Leu Cys Gln Ile Gly Asn Lys Gln			
245	250	255	
ata gcg gcg cta gtg gtg tgg gcg cgc gac atc ccg cac ttc agc cag			816
Ile Ala Ala Leu Val Val Trp Ala Arg Asp Ile Pro His Phe Ser Gln			
260	265	270	
ctt gag atg gaa gac cag atc ctg ctc atc aaa ggc tcc tgg aac gaa			864
Leu Glu Met Glu Asp Gln Ile Leu Leu Ile Lys Gly Ser Trp Asn Glu			
275	280	285	

ctg ctg ctc ttc gcc att gcg tgg cgg tct atg gag ttc ctg aca gaa			912
Leu Leu Leu Phe Ala Ile Ala Trp Arg Ser Met Glu Phe Leu Thr Glu			
290	295	300	
 gag cga gac ggc gtg gac ggc act ggg aac aca acc aca tcg ccc cca			960
Glu Arg Asp Gly Val Asp Gly Thr Gly Asn Arg Thr Thr Ser Pro Pro			
305	310	315	320
 caa ctt atg tgt ctc atg cct ggc atg acg ctg cac cgc aac tca gcg			1008
Gln Leu Met Cys Leu Met Pro Gly Met Thr Leu His Arg Asn Ser Ala			
325	330	335	
 ctg cag gcg ggc gtg ggg cag atc ttc gac cgc gtg ctg tcg gag ctg			1056
Leu Gln Ala Gly Val Gly Gln Ile Phe Asp Arg Val Leu Ser Glu Leu			
340	345	350	
 tcg ctg aag atg cgc acc ctg cgc gtc gac cag gcc gag tac gtc gcg			1104
Ser Leu Lys Met Arg Thr Leu Arg Val Asp Gln Ala Glu Tyr Val Ala			
355	360	365	
 ctc aag gcc atc ata ctg ctc aac cca gat gtg aag gga ctg aaa aac			1152
Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Pro Asp Val Lys Gly Leu Lys Asn			
370	375	380	
 agg caa gaa gtg gaa gtt tta cga gaa aag atg ttc ctg tgc ctg gac			1200
Arg Gln Glu Val Glu Val Leu Arg Glu Lys Met Phe Leu Cys Leu Asp			
385	390	395	400
 gag tac tgc cgc tcg cgc agt tcg gag gag ggt cgg ttc gcg gcg			1248
Glu Tyr Cys Arg Arg Ser Ser Glu Glu Gly Arg Phe Ala Ala			
405	410	415	
 ctg ctg cgc ctg ccc gcg tta cgt tcc att tca ctc aag agc ttc			1296
Leu Leu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Arg Ser Ile Ser Leu Lys Ser Phe			
420	425	430	
 gag cac ctg ttc ttc cac ctg gtg gcc gac acc agc atc gcc ggc			1344
Glu His Leu Phe Phe His Leu Val Ala Asp Thr Ser Ile Ala Gly			
435	440	445	
 tat atc cgc gac gcg ctg cgc aac cac gcg ccg ccc atc gac acc aac			1392
Tyr Ile Arg Asp Ala Leu Arg Asn His Ala Pro Pro Ile Asp Thr Asn			
450	455	460	
 atg atg			1398
Met Met			
465			

<210> 2

<211> 466

<212> PRT

<213> Heliothis virescens

<400> 2

Met Ser Val Ala Lys Lys Asp Lys Pro Thr Met Ser Val Thr Ala Leu
1 5 10 15

Ile Asn Trp Ala Arg Pro Leu Pro Pro Gly Gln Gln Gln Gln Pro Met
20 25 30

Thr Pro Thr Ser Pro Gly Asn Met Leu Gln Pro Met Ala Thr Pro Ser
35 40 45

Asn Leu Pro Thr Val Asp Cys Ser Leu Asp Ile Gln Trp Leu Asn Leu
50 55 60

Glu Gly Gly Phe Met Ser Pro Met Ser Pro Pro Glu Met Lys Pro Asp
65 70 75 80

Thr Ala Met Leu Asp Gly Leu Arg Asp Asp Ser Thr Pro Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Lys Asn Tyr Pro Pro Asn His Pro Leu Ser Gly Ser Lys His Leu
100 105 110

Cys Ser Ile Cys Gly Asp Arg Ala Ser Gly Lys His Tyr Gly Val Tyr
115 120 125

Ser Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val Arg Lys Asp
130 135 140

Leu Thr Tyr Ala Cys Arg Glu Glu Arg Asn Cys Ile Ile Asp Lys Arg
145 150 155 160

Gln Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Tyr Gln Lys Cys Leu Ala Cys
165 170 175

Gly Met Lys Arg Glu Ala Val Gln Glu Glu Arg Gln Arg Ala Ala Arg
180 185 190

Gly Thr Glu Asp Ala His Pro Ser Ser Ser Val Gln Val Gln Glu Leu
195 200 205

Ser Ile Glu Arg Leu Leu Glu Met Glu Ser Leu Val Ala Asp Pro Ser

210

215

220

Glu Glu Phe Gln Phe Leu Arg Val Gly Pro Asp Ser Asn Val Pro Pro
225 230 235 240

Lys Phe Arg Ala Pro Val Ser Ser Leu Cys Gln Ile Gly Asn Lys Gln
245 250 255

Ile Ala Ala Leu Val Val Trp Ala Arg Asp Ile Pro His Phe Ser Gln
260 265 270

Leu Glu Met Glu Asp Gln Ile Leu Leu Ile Lys Gly Ser Trp Asn Glu
275 280 285

Leu Leu Leu Phe Ala Ile Ala Trp Arg Ser Met Glu Phe Leu Thr Glu
290 295 300

Glu Arg Asp Gly Val Asp Gly Thr Gly Asn Arg Thr Thr Ser Pro Pro
305 310 315 320

Gln Leu Met Cys Leu Met Pro Gly Met Thr Leu His Arg Asn Ser Ala
325 330 335

Leu Gln Ala Gly Val Gly Gln Ile Phe Asp Arg Val Leu Ser Glu Leu
340 345 350

Ser Leu Lys Met Arg Thr Leu Arg Val Asp Gln Ala Glu Tyr Val Ala
355 360 365

Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Pro Asp Val Lys Gly Leu Lys Asn
370 375 380

Arg Gln Glu Val Glu Val Leu Arg Glu Lys Met Phe Leu Cys Leu Asp
385 390 395 400

Glu Tyr Cys Arg Arg Ser Arg Ser Ser Glu Glu Gly Arg Phe Ala Ala
405 410 415

Leu Leu Leu Arg Leu Pro Ala Leu Arg Ser Ile Ser Leu Lys Ser Phe
420 425 430

Glu His Leu Phe Phe His Leu Val Ala Asp Thr Ser Ile Ala Gly
435 440 445

Tyr Ile Arg Asp Ala Leu Arg Asn His Ala Pro Pro Ile Asp Thr Asn
450 455 460

Met Met